

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-189913

(43)Date of publication of application : 23.07.1996

(51)Int.CI.

G01N 27/327
G01N 27/416
G01N 30/64
G01N 33/483

(21)Application number : 07-142532

(71)Applicant : NOK CORP

(22)Date of filing : 17.05.1995

(72)Inventor : GOTO MASAO
NIKAMOTO HIROYUKI
MURE HIROKI
UCHIDA SHINICHI

(30)Priority

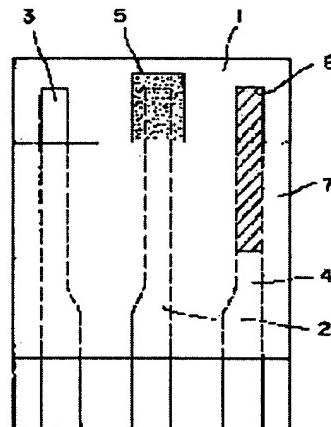
Priority number : 06171703 Priority date : 30.06.1994 Priority country : JP
06301671 11.11.1994

JP

(54) PROTEIN BIOSENSOR AND MEASURING METHOD USING IT**(57)Abstract:**

PURPOSE: To provide a protein biosensor which has a simple configuration, can be miniaturized, and is easy to manufacture and operate.

CONSTITUTION: In a biosensor wherein working, counter, and reference electrodes are provided on an insulating substrate 1, a protein sensitive metal thin film 5 and a silver/silver chloride electrode 6 are provided on a lead electrode 2, acting as the working electrode, and a lead electrode 4, acting as the reference electrode, respectively. Measurement of mass of protein with the use of the protein biosensor is done with a carrier added with KCl or NaCl.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

29.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3500772

[Date of registration] 12.12.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-189913

(43) 公開日 平成8年(1996)7月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 27/327

27/416

30/64

C

G 01 N 27/ 30 3 5 1

27/ 46 3 3 6 G

審査請求 未請求 請求項の数 9 FD (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平7-142532

(22) 出願日

平成7年(1995)5月17日

(31) 優先権主張番号 特願平6-171703

(32) 優先日 平6(1994)6月30日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(31) 優先権主張番号 特願平6-301671

(32) 優先日 平6(1994)11月11日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000004385

エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

(72) 発明者 後藤 正男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内

(72) 発明者 二家本 博之

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内

(72) 発明者 牟礼 博樹

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内

(74) 代理人 弁理士 吉田 俊夫

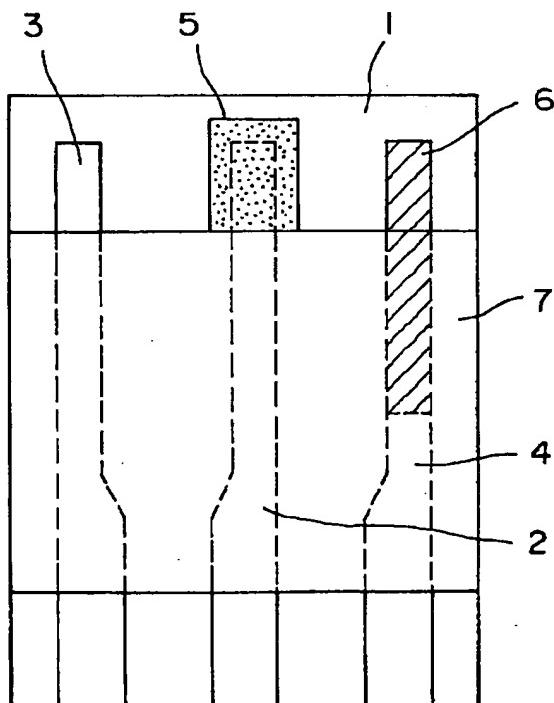
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質バイオセンサおよびそれを用いる測定方法

(57) 【要約】

【目的】 構成が簡単であり、そのため小型化が可能であり、製作性および操作性の点でも容易なたん白質バイオセンサを提供する。

【構成】 絶縁性基板上に作用極、対極および参照極を設けたバイオセンサにおいて、作用極のリード電極上にはたん白質感応性金属薄膜を、また参照極のリード電極上には銀/塩化銀電極をそれぞれ設けたたん白質バイオセンサ。このたん白質バイオセンサを用いてのたん白質量の測定は、KClまたはNaClを添加したキャリアを用いて行われる。



(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性基板上に作用極、対極および参照極を設けたバイオセンサにおいて、作用極リード電極上にはタンパク質感応性金属薄膜を、また参照極リード電極上には銀/塩化銀電極をそれぞれ設けてなるタンパク質バイオセンサ。

【請求項2】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質量を測定するに際し、無機塩化物を溶解させたキャリアが用いられることを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【請求項3】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質量を測定するに際し、約30~350℃に加熱されたタンパク質バイオセンサが用いられるることを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【請求項4】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質をフロー・インジェクション・アナリシス方式で測定するに際し、サンプル注入部とセンサとの間に分離用カラムを設置し、該分離用カラムから先に溶出されるタンパク質成分量に基づく出力を測定することを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【請求項5】 分離用カラムからの溶出液のpHをよりアルカリ性にした後、タンパク質成分量に基づく出力を測定することを特徴とする請求項4記載のタンパク質量の測定方法。

【請求項6】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質をフロー・インジェクション・アナリシス方式で測定するに際し、タンパク質の分子量以下の分画分子量を有する分離膜に測定サンプルを通し、分離膜から溶出されるタンパク質以外の成分に基づく出力を測定し、サンプル全体について測定された出力から前記出力を控除して、タンパク質量に基づく出力とすることを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【請求項7】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質をフロー・インジェクション・アナリシス方式で測定するに際し、タンパク質の分子量以下の分画分子量を有する分離膜に測定サンプルを通し、分離膜からタンパク質以外の成分を溶出させた後、分離膜に保持されたタンパク質を逆洗し、その逆洗溶出液について出力を測定することを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【請求項8】 無機塩化物を溶解させたキャリアを用いてセンサでの出力測定が行われる請求項4、5、6または7記載のタンパク質量の測定方法。

【請求項9】 請求項1記載のタンパク質バイオセンサを用いてタンパク質をフロー・インジェクション・アナリシス方式で測定するに際し、測定に先立ってタンパク質感応性金属薄膜をタンパク質水溶液またはアミノ酸水溶液で前処理することを特徴とするタンパク質量の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タンパク質バイオセンサおよびそれを用いる測定方法に関する。更に詳しくは、尿中タンパク質量の測定などに好適に用いられるタンパク質バイオセンサおよびそれを用いる測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来用いられているタンパク質センサは、作用極および対極が共にバルク状で、また参照極にはガラス筒を用いた飽和甘こう電極として用いられており、大型化するのを避けることができない。更に、ガラスから構成されている参照極は脆く、またその製作は煩雑なものであった。そして、これらの3極を使用して、バッチ方式あるいはF.I.A方式(フロー・インジェクション・アナリシス方式)でタンパク質量を測定しようとすると、操作上の構成が煩雑で、扱い難いといった欠点もみられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、構成が簡単であり、そのため小型化が可能であって、製作性および操作性の点でも容易なタンパク質バイオセンサを提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】かかる本発明の目的は、絶縁性基板上に作用極、対極および参照極を設けたバイオセンサにおいて、作用極リード電極上にはタンパク質感応性金属薄膜を、また参照極リード電極上には銀/塩化銀電極をそれぞれ設けたタンパク質バイオセンサによって達成される。

【0005】図1は、本発明に係るタンパク質バイオセンサの一態様の平面図であり、絶縁性基板1上には作用極リード電極2、対極3および参照極リード電極4がそれぞれ設けられている。そして、作用極リード電極2上にはタンパク質感応性金属薄膜5が、また参照極リード電極4上には銀/塩化銀電極6が設けられている。ここで、リード電極というのは、タンパク質感応性金属薄膜を形成させたものが作用極として作用し、また銀/塩化銀電極を形成させたものが参照極として作用するので、これらを形成させるための電極部分を指している。

【0006】かかる構成を有するタンパク質バイオセンサの製作に際しては、まず絶縁性基板1上に作用極リード電極2、対極3および参照極リード電極4をそれぞれ形成させた後、タンパク質感応性金属薄膜5および銀/塩化銀電極6の形成が任意の順序で行われる。

【0007】絶縁性基板としては、ガラス、セラミックス、プラスチック等の板状体あるいはフィルム状乃至シート状のものなどが用いられる。このような絶縁性基板上への作用極リード電極、対極および参照極リード電極の形成は、いずれも白金、カーボン、銀、金等の電極形成材料を用いての一般的な薄膜形成方法によって行われ

(3)

3

る。

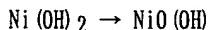
【0008】作用極リード電極2上には、ニッケル、銅、銀、コバルト等からなるタンパク質感応性金属の薄膜5が、スパッタリング法、蒸着法、スクリーン印刷法、メッキ法などによって、一般に約1000~10000Å、好ましくは約1000~6000Åの膜厚で形成される。

【0009】また、参照極リード電極4上には、参照極としての銀/塩化銀電極6の形成が行われる。銀/塩化銀電極の形成は、まず参照極リード電極上にスクリーン印刷法、蒸着法、スパッタリング法、メッキ法などによって銀電極を形成させた後、その銀電極部分を塩酸水溶液中に浸漬して定電流電解を行い、表面部分を塩化銀化させるという通常の方法によって行われる。

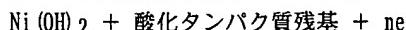
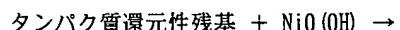
【0010】その後、タンパク質感応性金属薄膜5を形成させていない作用極リード電極2の大部分、先端部を除く対極3の大部分および銀/塩化銀電極6の一部または全部を除く参照極リード電極4の大部分は、シリコーン樹脂、ポリイミド樹脂、エポキシ樹脂等の絶縁膜7によって被覆される。

【0011】かかる構成のタンパク質バイオセンサを用いてのタンパク質量の測定は、次のような機構によって行われる。

【0012】例えば、作用極感応部をニッケルとした場合、このニッケルが強アルカリ溶液と接触すると、そこに水酸化ニッケル Ni(OH)_2 が生成する。ここで所定の電位が印加されると、



となり、生成した NiO(OH) はタンパク質の還元性残基であるアミノ基、チオール基、水酸基などと接触すると、この残基を酸化する。その際、電流が発生するので、発生した電流の出力を測定することにより、タンパク質量を測定することができる。



【0013】このような機構に基づくこのタンパク質バイオセンサを用いてのタンパク質量の測定は、バッチ方式あるいはFIA方式で行われる。測定に際しては、センサをセルに装着した後測定装置に組み込み、キャリアに溶解させた測定サンプル中のタンパク質量、例えば尿中のヒト血清アルブミン量、グロブリン量等に応答する出力を測定する。測定温度は、一般に室温乃至約100°C、好ましくは室温乃至約60°Cであり、温度を高めることによって出力を増加せしめることも可能である。

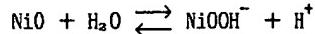
【0014】用いられるキャリアの組成は、約0.1~10mMの NiSO_4 およびアルカリ性を示す量の NaOH または KOH を溶解させた水溶液からなり、そのアルカリ性の程度はセンサ素子の温度によって変化せ得る。

【0015】即ち、作用極リード電極である白金上に設けられるタンパク質感応性金属薄膜としてのニッケル薄膜は、例えば0.1mM NiSO_4 水溶液含有キャリア液中、室

4

温条件下ではpH12~13で NiOOH^- 種を表層に形成させる。この NiOOH^- 種がタンパク質を酸化する際酸化電流を流すが、このpH範囲内でしか NiOOH^- 種が形成されないため、タンパク質に対して定量性のある応答が得られないものと推測される。

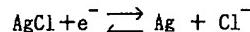
【0016】ニッケル電極上での NiOOH^- は、



という平衡反応で形成するものと考えられ、この反応の平衡pH値は温度によって低下させることができる。具体的には、センサ素子を加熱することにより、より低いアルカリ側pH値でたん白活性種である NiOOH^- を電極表面に形成させることができ、それによってタンパク質に対して定量性のある応答を確保することができる。

【0017】具体的には、センサの加熱温度を約30~35°C、好ましくは約50~300°Cとすることにより、タンパク質に対して定量性のある応答をpH13より低い側に漸次拡大し、例えば300°CではそのpH範囲を13~9の範囲迄拡大することができる。

【0018】用いられるキャリア水溶液中には、約1~2000mM、好ましくは約10~500mMの無機塩化物、好ましくは塩化カリウムまたは塩化ナトリウムを添加しておくことが望ましい。これらの塩化物は、参照極として用いられている AgCl の平衡をとり、参照極の電位を安定させ、その耐久性を高めるというように作用する。



【0019】実際の測定に際してはFIA方式が用いられることが多い、具体的には次のような方法での測定が行われる。その際、測定サンプル中に含まれるタンパク質以外の成分による出力の排除が行われる。

【0020】(i)サンプル注入部とセンサとの間に分離用カラムを設置し、この分離用カラムから先に溶出されるタンパク質成分量に基づく出力を測定する。

【0021】図2は、かかる測定法のフローシートであり、ポンプによってチューブ11中を送られてきたキャリアに、手動またはポンプを用いた自動吸引式のサンプルインジェクタ12から測定サンプルが注入され、分離用カラム13から先に溶出されるタンパク質成分の量に基づく出力をセンサ14によって測定している。

【0022】測定サンプル中に含まれるタンパク質以外の成分としては、例えば測定物質が尿、血液、発酵培養液などの場合には、アミノ酸、グルコース、尿素、尿酸、アンモニア、クレアチニン、アスコルビン酸等の多種類の電極活性物質が含まれており、これらの物質がタンパク質と共に混在していると、このセンサでの選択的測定は困難である。

【0023】これらの他の物質の選択的除去のために、これらを選択的に分離させる分離用カラムが用いられる。このような分離用カラムの充填剤としては、混在す

(4)

5

る物質の種類に応じて、デキストランゲル、アクリルアミドゲル、ハイドロンゲル、バイコールガラス、ポーラスシリカ、ステレンゲル等のゲルクロマトグラフィー用充填剤；シリカ系イオン交換体、高分子系イオン交換樹脂等のイオン交換性充填剤；ペリキュラー型、ゲル型、ポーラス型等の吸着分配用充填剤；シリカゲルやポーラスポリマーに特定の酵素や抗体を固定化させたアフィニティクロマトグラフィー用充填剤；表面に同時にしかも一定の規則性で親油性部分および親水性部分を有するミクロドメイン構造を有する充填剤などが用いられる。

【0024】そして、例えば分離用カラムにゲルクロマトグラフィー用充填剤を用いた場合には、タンパク質とそれ以外の物質が混在する測定サンプルを分離用カラムに注入した場合、高分子量を有するタンパク質成分のみが先に溶出され、低分子量の他の物質は一旦吸着され、後に溶出されるので、先に溶出されたものについての出力をセンサで測定すれば、それがタンパク質量に対応することになる。他の充填剤を用いた場合も、同様である。

【0025】出力は、アルカリ性の程度が高い程高められるが、分離用カラムに充填される充填剤の種類によっては、アルカリ性に耐えられないものもある。あるいは、センサでの測定液のpHを更に高めることが望まれる場合もある。このような場合には、例えばpH5～12の状態で溶出してきたタンパク質の溶出液に、更にpHの高いキャリアをポンプを用いてチューブ15からミキシング部16に送り、混合するようなことも行われ、そのフローシートが図3に示されている。

【0026】(2) タンパク質の分子量以下の分画分子量を有する分離膜に測定サンプルを通し、分離膜から溶出されるタンパク質以外の成分に基づく出力を測定し、サンプル全体について測定された出力から前記出力を控除して、タンパク質量に基づく出力とする。

【0027】図4は、かかる測定法のフローシートであり、ポンプによってチューブ11中を送られてきたキャリアにサンプルインジェクタ12から測定サンプルが注入され、バルブ17によって分離膜18に送られた後、バルブ19によってセンサ14に送られ、まずそこでの出力測定が行われる。この出力は、タンパク質以外の成分に基づくものである。次いで、バルブ17および19を切り換え、分離膜18を通らず、チューブ20を通った測定サンプルについて、センサ14での出力を測定し、この出力から前記出力を控除することによって、測定サンプル中に含まれるタンパク質量に基づく出力とことができる。

【0028】分離膜としては、ポリスルホン、銅アンモニアセルロース、脱酢酸セルロースアセテート、アクリロニトリル共重合体、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、エチレン-酢酸ビニル共重合体けん化物、芳香族ポリアミド、カーボネート-エチレンオキシド共重合体、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレン、

6

ポリプロピレン、セラミックス等の平膜状、中空糸状、チューブ状、スパイラル状などの多孔質体よりなる精密口過膜や限外口過膜などが用いられる。これらの分離膜は、例えば分子量約70000のヒト血清アルブミンを含有する測定サンプルについていえば、それ以下の分画分子量、例えば分画分子量約50000のものを用いることにより、ヒト血清アルブミンは透過させず、分子量約50000以下の物質のみを透過させる。

【0029】用いられた分離膜は、多数回の使用により目詰りを起こすようになるので、その際あるいはそうなる以前に、ポンプによってチューブ21からの洗浄液、好みしくはキャリアと同じpHの洗浄液を分離膜18に送り、チューブ22から排出させる逆洗操作を行うことが好ましい。

【0030】図5は、測定サンプルの出力からタンパク質以外の成分に基づく出力を控除することによって、タンパク質量に基づく出力を求めんとする測定法の他の態様のフローシートである。この態様においては、測定サンプルの出力をセンサ14で測定した後分離膜18を通して、分離膜18から溶出したタンパク質以外の成分に基づく出力の測定がセンサ14で行われ、その出力差がタンパク質量に基づくものとして求められる。なお、分離膜18の逆洗操作は、図4の場合と同様に行われる。

【0031】(3) タンパク質の分子量以下の分画分子量を有する分離膜に測定サンプルを通し、分離膜からタンパク質以外の成分を溶出させた後、分離膜に保持されたタンパク質を逆洗し、その逆洗溶出液について出力を測定する。

【0032】図6にフローシートが示されるこの測定法では、タンパク質の分子量以下の分画分子量を有する分離膜に測定サンプルを通し、分離膜からタンパク質以外の成分を溶出させる迄は、前記(2)の測定法と同じ操作が行われ、溶出液はバルブ25およびチューブ26から排出される。その後、保持されたタンパク質の逆洗が行われ、この際分離膜の目詰り防止の効果も期待される。

【0033】逆洗は、測定サンプル調製に用いられたキャリアと同等あるいはそれ以上のアルカリ側pHを示すキャリアをチューブ23およびバルブ24から分離膜18中に供給し、その逆洗溶出液はバルブ17からチューブ27に送られ、センサ14でのタンパク質量に基づく出力の測定が行われる。

【0034】更に、これらのFIA方式において、測定に先立ってタンパク質感応性金属薄膜をタンパク質水溶液またはアミノ酸水溶液で前処理しておくと、良好な再現性の得られることが判明した。このことに関しては、原理的には次のようなことが考えられる。例えば、タンパク質またはアミノ酸の活性種であるNiOH⁻は、Niの表面に積み重なるように形成されており、中でも最も表面側のNiOH⁻はその質および量が経時的に変化するものと思われる。そこで、このように不安定なNiOH⁻を測定開

(5)

7

始前に比較的高濃度のタンパク質水溶液あるいはアミノ酸水溶液と反応させ、質的および量的に均一なものとすることにより、検量性や再現性を改善することができたものと考えられる。

【0035】ここで、タンパク質水溶液としては例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等が、またアミノ酸としては例えグリシン、ロイシン等が約50~100mg/dl、好ましくは約300~700mg/dlの高濃度水溶液として用いられる。これらの水溶液は、pHを約4~13、好ましくは約5~8に調整した上で、約5~500μl、好ましくは約50~200μlが、サンプル測定前のセル内に注入することによって用いられる。

【0036】

【発明の効果】本発明に係るタンパク質バイオセンサは、絶縁性基板上に形成された作用極、対極および参照極の内の作用極リード電極上に、タンパク質感応性金属薄膜を形成させるだけであるので、構成が簡単であり、そのため小型化が可能であって、製作も容易であり、更にバッチ方式、FIA方式のいずれでも、操作を簡単にしかもタンパク質の選択的な検出を行うことを可能とする。特に、FIA方式では、測定に先立って、タンパク質感応性薄膜をタンパク質またはアミノ酸の水溶液で前処理しておくと、その出力の経時的な変化、ひいては検量性や再現性の低下を有効に防止することができる。

【0037】また、参照極リード電極上に形成させた銀/塩化銀電極は、測定サンプルの調製のために用いられるキャリア中に塩化カリウム、塩化ナトリウム等の無機塩化物が添加されているため、AgClの解離平衡が保たれ、電位が安定化されるため、その耐久性が高められるという効果が奏せられる。この際に印加される電位は、約0.01~0.6V、好ましくは約0.1~0.5Vである。従つて、このタンパク質バイオセンサは、腎臓の機能評価の指標となるタンパク質量、特に尿タンパク質量の測定に容易に用いることができ、家庭でのセルフケア(便器着用タイプの尿タンパク質センサ用途など)、集団検診時の尿タンパク質診断、臨床検査などに広く用いることができる。

【0038】

【実施例】次に、実施例について本発明を説明する。

【0039】実施例1

アルミナ基板(京セラ製品A-493)上に、図1に示される如き形状の白金対極、白金作用極リード電極および白金参照極リード電極を、いずれも4000Åの膜厚で蒸着法により形成させた。次いで、参照極リード電極上にスクリーン印刷法で銀ペーストを印刷し、焼成して銀電極とした。この銀電極部分を0.1M塩酸中に浸漬し、0.6mA/cm²の電流密度で20分間の定電流電解を行い、参照極リード電極表面を塩化銀化した。この定電流電解には、ボテンショガルバノスタット(北斗電工製HA-501)が用いられた。

(5)

8

【0040】その後、メタルマスクでマスキングして、作用極リード電極の上部に膜厚4000Åのニッケル薄膜を、スパッタリング法によって形成させた。更に、スクリーン印刷法によって、所定部位にシリコーン樹脂をスクリーン印刷し、絶縁膜を形成させた。

【0041】このようにして製作されたセンサをセルに装着した後、FIA測定装置に組み込み、尿タンパク質の主成分であるヒト血清アルブミンに対する応答性を測定した。測定には、電流検出計(B.A.S.社製LC-4B)が用いられた。サンプルは、0.1mM NiSO₄および0.1M NaOHに50mMのKClを加えたpH13.0のキャリアの溶液で調製された。測定は、次の条件に従って行われた。

サンプルインジェクタとセンサ間の距離：1m

センサセル容量：28μl

サンプル注入量：100μl

使用チューブ：テフロン製、内径0.8mm、外径1/16インチ

流速：1.4ml/分

作用極vs. 参照極の印加電圧：0.4V

【0042】ヒト血清アルブミン濃度10mg/dl、50mg/dlまたは100mg/dlに対して、図7のグラフに示されるような出力ピークが得られ、タンパク質量の測定が正確に行えることが分かった。

【0043】実施例2

実施例1で製作されたセルを用い、図2に示されるFIA方式での測定が、電流検出計(LC-4B)を用いて行われた。分離用カラムには、ゲルクロマトグラフィー用充填剤が、また測定サンプルとしては、濃度10mg/dl、50mg/dlまたは100mg/dlのヒト血清アルブミンにそれぞれ100mg/dlのグリシンを混合し、キャリア溶液で調製されたものが用いられた。ただし、実施例1と同様組成のキャリアは、pH12.0のものが用いられた。測定は、次の条件に従って行われた。

サンプルインジェクタと分離用カラム間の距離：1m

分離用カラムとセンサ間の距離：1m

センサセル容量：28μl

サンプル注入量：100μl

使用チューブ：テフロン製、内径0.8mm、外径1/16インチ

流速：1.4ml/分

作用極vs. 参照極の印加電圧：0.4V

【0044】センサによる出力の測定では、分離用カラムにおける保持時間の異なる2種のピークが認められた。この内、先に溶出してきた溶出物がヒト血清アルブミンであって、そのピークをプロットすると図8に示されるような検量線が得られた。

【0045】実施例3

実施例2において、図3に示されるFIA方式での測定が行われた。即ち、分離用カラムからの先の溶出液(pH12.0)にそれよりも強アルカリ性のキャリアがミキシング

(6)

9

部(分離用カラムとミキシング部間距離50cm、ミキシング部とセンサ間距離50cm)で混合され、そのpHを13.0とした後、センサでの出力測定が行われた。そのピークをプロットすると、図8に示されるような検量線が得られ、出力の増加が認められた。

【0046】実施例4

実施例1で製作されたセルを用い、図4に示されるFIA方式での測定が、電流検出計(LC-4B)を用いて行われた。分離膜には、分画分子量15000のポリスルホン中空糸膜が、また測定サンプルとしては、濃度10mg/dl、50mg/dlまたは100mg/dlのヒト血清アルブミンにそれぞれ100mg/dlのグリシンを混合し、キャリア溶液で調製された*

測定サンプル	出力①(nA)	出力②(nA)	出力差(nA)
10mg/dlグリシン	485	488	3
" + 10mg/dl HSA	488	563	75
" + 50mg/dl HSA	484	904	420
" + 100mg/dl HSA	486	1319	833

【0049】実施例5

実施例4において、測定サンプル(ただし、pH7.0のキャリア溶液)を分離膜(サンプルインジェクタと分離膜間の距離1mm、分離膜とセンサ間の距離2mm)に通し、分離膜からの溶出液を除去した後、pH13.0のキャリアよりなる逆洗液で分離膜に保持されたタンパク質を逆洗し、その逆洗溶出液について出力を測定すると、図10のグラフに示されるような検量線が得られた。

【0050】実施例6

実施例1で製作されたセンサをセルに装着した後、FIA測定装置に組み込み、タンパク質であるヒト血清アルブミンの水溶液に対する応答性を測定した。測定は、0.1mM NiSO₄水溶液および50mMのKClにNaOHを加え、pHを8, 9, 10, 11, 12または13に調節した水溶液よりなるキャリア溶液をサンプルとして、電流検出計(LC-4B)を用いて、次の測定条件に従って行われた。

サンプルインジェクタとセンサ間の距離：1mm

センサセル容量：30μl

サンプル注入量：10μl

使用チューブ：テフロン製、内径0.8mm、外径1/16インチ

流速：1.4ml/分

作用極vs. 参照極の印加電圧：0.4V

センサ素子温度：25°C、60°Cまたは300°C

【0051】ヒト血清アルブミン濃度10mg/dl、20mg/dl、50mg/dlまたは100mg/dlに対して、図11(25°C)、図12(60°C)または図13(300°C)のグラフに示されるような検量線が得られた。この結果から、センサ温度25°CではpH12~13で、60°CではpH11~13で、また300°CではpH9~13で濃度に比例した出力電力が得られ、即ちこのようなpH範囲でタンパク質量の測定が正確に行えることが分かる。

【0052】実施例7

10

*ものが用いられた。ただし、実施例1と同様組成のキャリアは、pH13.0のものが用いられた。測定条件は、実施例2と同様である。

【0047】測定に際しては、まず測定サンプルを分離膜に通し、分離膜からの溶出液(グリシン溶液)についての出力(出力①)を測定した後、分離膜を通さない測定サンプルについての出力(出力②)を測定し、その出力差(出力②-出力①)をヒト血清アルブミン(HSA)濃度についてプロットすると、図9のグラフに示されるような検量線が得られた。

【0048】なお、プロットされた出力差は次のデータから算出された。

測定サンプル	出力①(nA)	出力②(nA)	出力差(nA)
10mg/dlグリシン	485	488	3
" + 10mg/dl HSA	488	563	75
" + 50mg/dl HSA	484	904	420
" + 100mg/dl HSA	486	1319	833

実施例1で製作されたセンサをセルに装着した後、FIA測定装置に組み込み、濃度500mg/dlのヒト血清アルブミン水溶液(pH6.0)100μlを、サンプル測定前にセル内に注入することにより、タンパク質感応性ニッケル薄膜と接触させた。このヒト血清アルブミン水溶液はチューブ中を流れるキャリア水溶液(0.1mM NiSO₄、0.1M NaOH、50mM KCl; pH 13.0)によって除去される。

【0053】以上のような前処理を行った後、次のような条件下で、pH 6.0の水で調製された各種濃度のヒト血清アルブミン水溶液に対する応答性を、電流検出計(LC-4B)を用いて測定を行った。

サンプルインジェクタとセンサ間の距離：1mm

センサセル容量：50μl

サンプル注入量：100μl

使用チューブ：テフロン製、内径0.8mm、外径1/16インチ

測定温度：40°C

流速：1.4ml/分

作用極vs. 参照極の印加電圧：0.4V

終夜条件：0.4V 電源 ON、キャリアポンプ OFF

【0054】ヒト血清アルブミン濃度0、10、25、50、75または100mg/dlに対しては、図14のグラフに示されるような検量性(A)が得られた。また、測定初日から30日後に再び濃度500mg/dlのヒト血清アルブミン水溶液による前処理を行い、(A)と同様に測定を行ったときの検量性(B)、および(B)の操作後、再度前処理を行うことなく測定を繰り返して行ったときの検量性(C)を求めたが、いずれも(A)の測定値と比べて大きな変化はみられず良好であった。このとき、50mg/dlのヒト血清アルブミン水溶液に対する応答値の再現性について、下記式を用いて変動係数を求めたところ、2.0% (n=10) であった。

変動係数 (C.V. 値) = 標準偏差 / 平均値 × 100 (%)

(7)

なお、タンパク質感応性ニッケル薄膜を前処理する操作を行わない場合の変動係数は、6.6% ($n=10$) であった。

【0055】実施例8

実施例1で製作されたセンサをセルに装着した後、FIA測定装置に組み込み、濃度500mg/dlのグリシン水溶液(pH6.0) 100 μ lを用いて、実施例7と同様に前処理および測定を行った。

【0056】検量性は、初期および30日後共に、ヒト血清アルブミン濃度0～100mg/dlの範囲で求めた。この結果から、実施例7と同様に、ヒト血清アルブミン濃度50mg/dlにおける再現性について検討を行ったところ、変動係数は2.2% ($n=10$) であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るタンパク質バイオセンサの一態様の平面図である。

【図2】本発明測定方法の第1の態様のフローシートである。

【図3】第1の測定方法の変形した態様のフローシートである。

【図4】本発明測定方法の第2の態様のフローシートである。

【図5】第2の測定方法の変形した態様のフローシートである。

【図6】本発明測定方法の第3の態様のフローシートである。

【図7】実施例1における測定結果を示す検量線グラフ

である。

【図8】実施例2～3における測定結果を示す検量線グラフである。

【図9】実施例4における測定結果を示す検量線グラフである。

【図10】実施例5における測定結果を示す検量線グラフである。

【図11】実施例6において、センサ素子温度25℃での測定結果を示す検量線グラフである。

【図12】実施例6において、センサ素子温度60℃での測定結果を示す検量線グラフである。

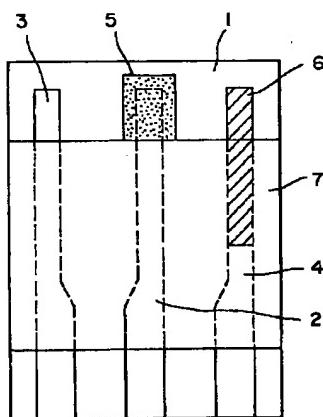
【図13】実施例6において、センサ素子温度300℃での測定結果を示す検量線グラフである。

【図14】実施例7で得られた検量線グラフである。

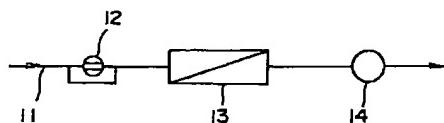
【符号の説明】

1	絶縁性基板
2	作用極リード電極
3	対極
4	参照極リード電極
5	タンパク質感応性金属薄膜
6	銀/塩化銀電極
12	サンプルインジェクタ
13	分離用カラム
14	センサ
18	分離膜

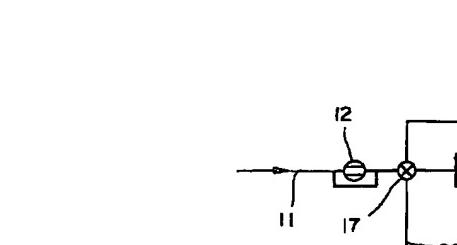
【図1】



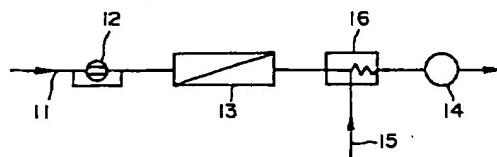
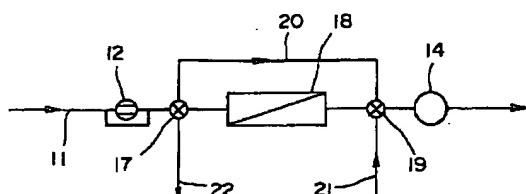
【図2】



【図3】

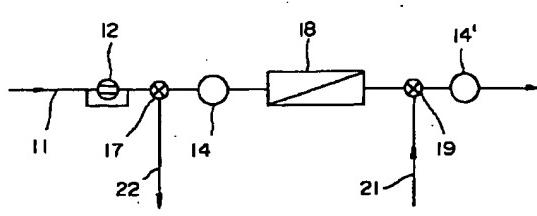


【図4】

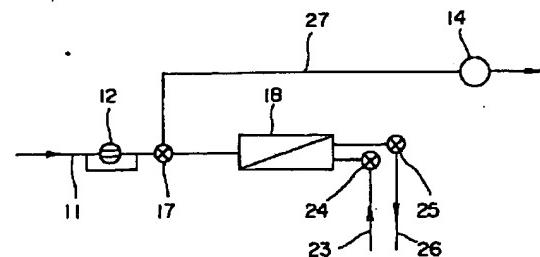


(8)

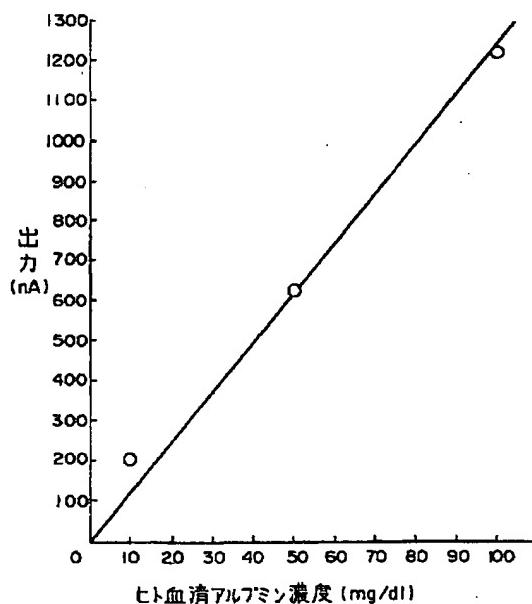
【図5】



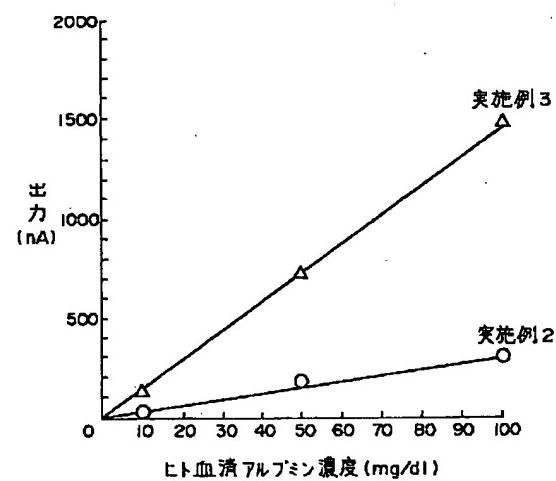
【図6】



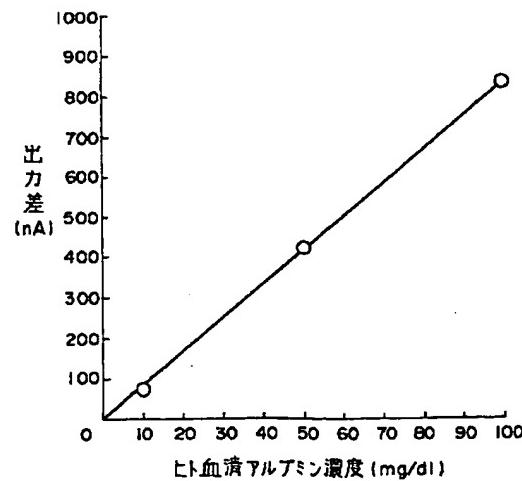
【図7】



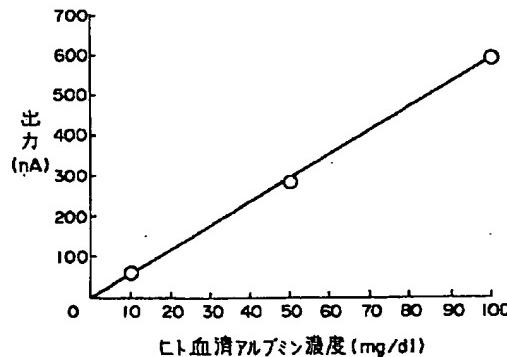
【図8】



【図9】

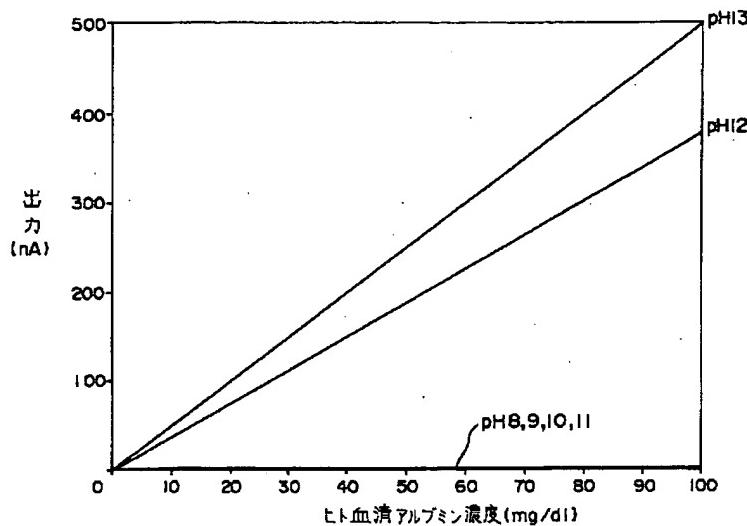


【図10】

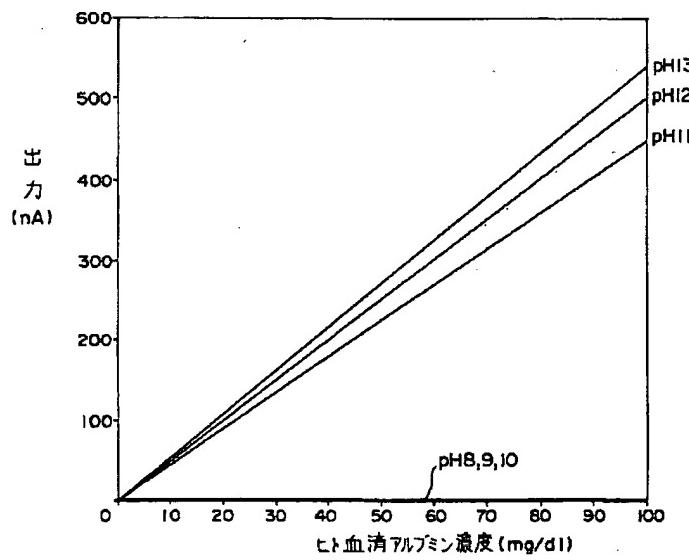


(9)

【図11】

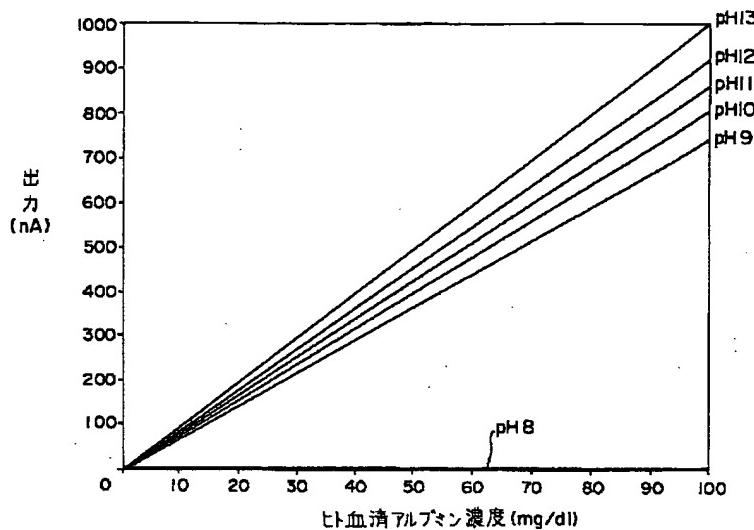


【図12】

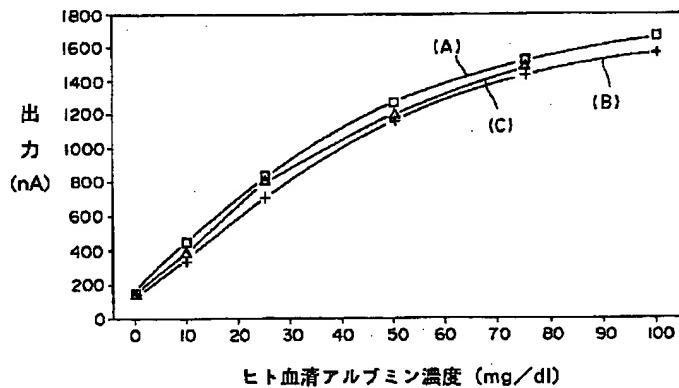


(10)

【図13】



【図14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

G 01 N 33/483

識別記号 庁内整理番号

F

F I

技術表示箇所

G 01 N 27/46

336 B

(72) 発明者 内田 慎一

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌ
オーケー株式会社内